

Sorting device for biological cells or viruses

Publication number: DE19520298

Publication date: 1996-12-05

Inventor: DIESEL EDGAR DR (DE); WEICHEL WALTER DR (DE)

Applicant: BAYER AG (DE)

Classification:





- International: **B01L3/00; B03C1/035; F15C1/08; G01N15/14; B01L3/00; B03C1/02; F15C1/00; G01N15/14; (IPC1-7): G01N33/483; B03C1/30; B07C5/344; C12M1/34; C12M1/42; C12Q1/06; G01N15/10; G01N15/14; G01N21/64**

- european: **B01L3/00C6M; B03C1/035; F15C1/08**

Application number: DE19951020298 19950602

Priority number(s): DE19951020298 19950602

Also published as:

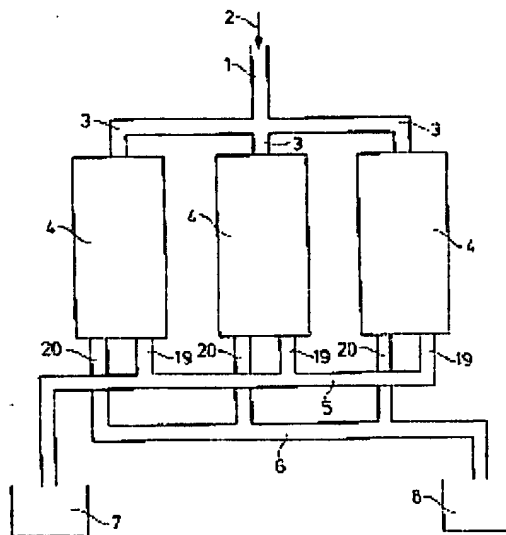
 EP0745682 (A1)
 US5837200 (A1)
 JP8332074 (A)
 EP0745682 (B1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE19520298

Abstract of corresponding document: **US5837200**

The sorting device is able to sort biological objects, particularly cells or viruses, in liquids as a function of physically measurable criteria or properties. The sorting apparatus is provided with a feed inlet (1) for the biological liquid which branches into a microstructured system of multi-parallel main channels (3) and sorting modules (4) each with a switch unit for distribution to two different outlet channels (19,20). Inside a sorting module (4), at least one sensor (9,10) is arranged on each main channel, and a sorting actuator (12) controlled by the relevant sensor is arranged on each switch unit (11). Finally, each outlet channel (20) is connected to a collecting channel (6) for the unselected biological cells or viruses, and each outlet channel (19) is connected to a collecting channel (5) for the selected cells or viruses. If the cells or viruses are magnetically marked, it is possible to dispense with the sensor (9,10) on the main channels (3). In that case, the sorting actuators arranged on the switch units are designed as magnetic deflection modules (37,38). In this case, the magnetic deflection modules undertake direct classification or selection as a function of the magnetic properties of the biological objects to be sorted.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑩ DE 195 20 298 A 1

②1 Aktenzeichen: 195 20 298.8
②2 Anmeldetag: 2. 6. 95
④3 Offenlegungstag: 5. 12. 96

⑤1 Int. Cl.⁸:
G 01 N 33/483
G 01 N 21/64
C 12 M 1/34
C 12 M 1/42
C 12 Q 1/08
G 01 N 15/10
G 01 N 15/14
B 07 C 5/344
B 03 C 1/30

DE 195 20 298 A 1

⑦1 Anmelder:
Bayer AG, 51373 Leverkusen, DE

⑦2 Erfinder:
Dießel, Edgar, Dr., 50679 Köln, DE; Weichel, Walter,
Dr., 51519 Odenthal, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

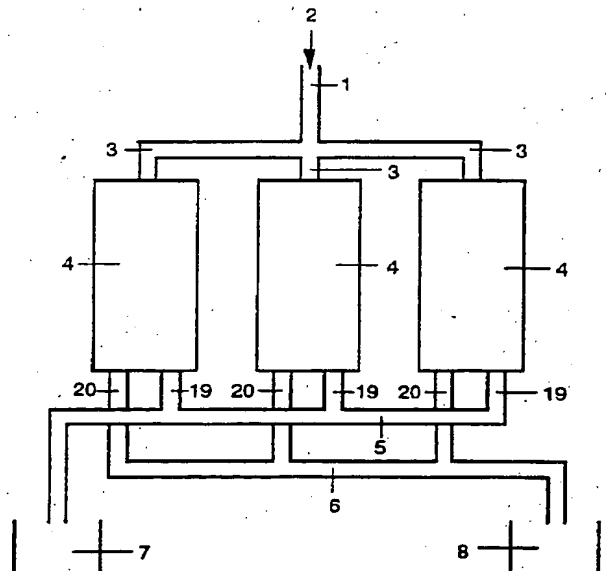
DE 39 02 402 C1
DE 38 40 462 C2
DE 38 27 252 C2
DE 35 34 973 C2
DE 33 10 551 C2
DE 39 26 462 A1
DE 38 08 798 A1
DE 37 12 862 A1
DE 35 22 365 A1
DE 33 10 665 A1
DE-OS 15 98 634
US 54 11 863

US 53 40 749
US 49 10 148
US 47 56 427
US 47 10 472
EP 05 81 673 A1
EP 04 42 025 A1
EP 04 12 431 A2
EP 01 77 718 A2
WO 92 16 829 A1
WO 91 15 750 A1
WO 85 05 684 A1

STEINKAMP, John A., et.al.: Flow cytometer for
resolving signals from heterogeneous fluorescence
emissions and quantifying lifetime in
fluorochrome-labeled cells/particles by
phase-sensitive detection. In: Rev. Sci. Instrum. 64
(12), Dec 1993, S.3440-3450;
JP Patents Abstracts of Japan: 61- 81779
A., C-369, Aug. 29, 1986, Vol. 10, No. 252;
61- 81778 A., C-369, Aug. 29, 1986, Vol. 10, No. 252;
62-171677 A., C-469, Jan. 16, 1988, Vol. 12, No. 15;

⑤4 Sortiervorrichtung für biologische Zellen oder Viren

⑤7 Die Sortiervorrichtung kann biologische Objekte, insbesondere Zellen oder Viren, in Flüssigkeiten in Abhängigkeit von physikalisch meßbaren Kriterien bzw. Eigenschaften sortieren. Der Sortierapparat ist mit einer Zuführung (1) für die biologische Flüssigkeit versehen, die sich in ein mikrostrukturiertes System von multiparallelen Hauptkanälen (3) und Sortiermodulen (4) mit jeweils einer Weiche zur Aufteilung in zwei verschiedene Auslaßkanäle (19, 20) verzweigt. Innerhalb eines Sortiermoduls (4) ist an jedem Hauptkanal mindestens ein Sensor (9, 10) und an jeder Weiche (11) ein von dem jeweiligen Sensor gesteuerter Sortieraktor (12) angeordnet. Schließlich ist jeder Auslaßkanal (20) mit einem Summenkanal (6) für die unselektierten biologischen Zellen oder Viren und jeder Auslaßkanal (19) mit einem Summenkanal (5) für die selektierten Zellen bzw. Viren verbunden. Für den Fall, daß die Zellen oder Viren magnetisch markiert sind, kann der Sensor (9, 10) an den Hauptkanälen (3) entfallen. Die an den Weichen angeordneten Sortieraktoren werden dann als magnetische Ablenkmodule (37, 38) ausgeführt. Die magnetischen Ablenkmodule übernehmen in diesem Fall die direkte Klassifizierung bzw. Selektierung in Abhängigkeit der magnetischen Eigenschaften der zu sortierenden biologischen Objekte.



DE 195 20 298 A 1

Die Erfindung betrifft einen Sortierapparat für einzelne biologische Objekte in einer Flüssigkeit zum Einsatz in der Biotechnologie. Der Sortierapparat beruht darauf, daß die Objekte hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften direkt oder indirekt mit Hilfe geeigneter Sensoren klassifiziert werden. Die Objekte können zur Klassifizierung auch in signifikanter Weise markiert werden. Ein an einer Weiche angebrachter Sortieraktor kann dann die klassifizierten biologischen Objekte auf räumlich getrennte Auslaßkanäle aufteilen. Bei der indirekten Klassifizierung wird der Sortieraktor von dem zugeordneten Sensor in Abhängigkeit von der Signallintensität des Sensors gesteuert. Als Sensoren sind in erster Linie Fluoreszenzsensoren geeignet. Unter "biologischen Objekten" werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung vor allem (lebende) biologische Zellen verstanden.

Vorrichtungen zur fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) sind kommerziell erhältlich. Bei den Sortierprinzipien unterscheidet man zwischen fluidischen Methoden und tröpfchenorientierten Systemen. Bei beiden Methoden werden die zu untersuchenden Zellen durch eine Hüllflüssigkeit vereinzelt, so daß sie individuell fluoreszenzspektroskopisch oder durch Detektion des Streulichts vermessen werden können.

Im ersten Fall wird die zu untersuchende Dispersion aus zu untersuchenden Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl geführt, der aufgrund eines Fluoreszenzsignals in einen Arm von nicht zu sortierenden und in einen Arm von zu sortierenden Zellströmen aufgespalten wird. Hierbei kann die Strömung durch einen piezoelektrischen Transducer oder einen Ultraschallwandler entsprechend beeinflußt werden.

Die am meisten verwendete Methode stellt die Sortierung von einzelnen Tröpfchen dar. Bei diesem Prinzip tritt ein Zellstrom durch eine Düse aus. Aufgrund einer definierten mechanischen Schwingung der Düse reißt der Flüssigkeitsstrahl in einer wohl definierten Entfernung unterhalb des Meßortes in Tröpfchen auf, die jeweils maximal eine Zelle tragen. In Abhängigkeit von einer Schwellintensität wird ein Sortiervorgang eingeleitet, indem der Flüssigkeitsstrahl über die Hüllflüssigkeit elektrostatisch aufgeladen wird. Ist ein geladenes Tröpfchen mit der auszusortierenden Zelle vom Flüssigkeitsstrahl abgerissen, so wird der Flüssigkeitsstrahl augenblicklich wieder entladen, so daß die folgenden Tropfen nicht aufgeladen werden. Damit bleibt nur das Tröpfchen mit der zu selektierenden Zelle geladen. Die Tropfen fliegen nun durch das Ablenkkfeld eines Kondensators. Das geladene Tröpfchen mit der zu sortierenden Zelle wird entsprechend abgelenkt und landet in einem Sortiergefaß, während die nicht zu sortierenden Tropfen geradeaus in ein anderes Gefäß fliegen.

Im Gegensatz zum fluidischen Sortierer werden mit dem Tröpfchensortierer höhere Sortierraten erzielt. So ist er in der Lage, pro Tag ca. 10^8 Zellen zu prozessieren. Hierbei ist jedoch damit zu rechnen, daß nur 80% der zu selektierenden Zellen tatsächlich sortiert werden können. Bei sehr seltenen Ereignissen in einer Zellpopulation sind jedoch höhere Durchsätze wünschenswert von etwa 10^{10} Zellen.

Weiterhin ist ein magnetisches Verfahren bekannt (MACS = Magnetic activated cell sorter), das zur Separation großer Zellpopulationen kommerziell erhältlich ist. Bei diesem Sortiervorgang wird die Bindung der relevanten Zellen an magnetische Beads ausgenutzt. Im

Separationsschritt werden die in dieser Weise markierten Zellen in der MACS-Säule durch ein inhomogenes Magnetfeld zurückgehalten, während die nichtmarkierten Zellen ungehindert die Säule passieren. Hierbei kann jedoch nur zwischen magnetischen und nichtmagnetischen Zellen unterschieden werden.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einzelne biologische Objekte aufgrund einer magnetischen Markierung oder aufgrund einer Klassifizierung durch meßtechnisch erfaßbare Eigenschaften räumlich zu separieren, wobei der Zelldurchsatz signifikant verbessert werden soll.

Ausgangspunkt ist dabei eine Sortiervorrichtung mit folgenden prinzipiellen Merkmalen:

- i) Die Flüssigkeit mit den zu sortierenden biologischen Objekten strömt über eine Zuführung durch einen Hauptkanal, an dem eine Weiche mit mindestens zwei Auslaßkanälen A, B angeordnet ist.
- ii) An dem Hauptkanal kann zur Detektierung und Klassifizierung von nicht magnetisch markierten Zellen mindestens ein Sensor angeordnet sein.
- iii) An der Weiche ist ein Sortieraktor angebracht, der die magnetisch markierten, bzw. klassifizierten Zellen anschließend selektiv auf die Auslaßkanäle A, B verteilt.

Die erfindungsgemäße Lösung der oben angegebenen Aufgabe besteht im Falle von magnetisch markierten Zellen darin,

- a) daß sich die Zuführung in ein mikrostrukturiertes System von multiparallelen Hauptkanälen und Sortiermodulen mit jeweils einer Weiche zur Aufteilung in zwei verschiedene Auslaßkanäle A, B verzweigt,
- b) daß innerhalb eines Sortiermoduls an jedem Hauptkanal jeweils ein magnetischer Ablenkmodul als Sortieraktor angeordnet ist
- c) und daß jeder Auslaßkanal B mit einem Summenkanal für die unselektierten Zellen und jeder Auslaßkanal A mit einem Summenkanal für die selektierten Zellen verbunden ist.

Eine alternative Lösung, die auch im Falle von nicht magnetisch markierten Objekten zur Anwendung kommen kann und bei der die Objekte ggf. vorher optisch markiert werden, besteht erfindungsgemäß darin,

- a) daß sich die Zuführung in ein mikrostrukturiertes System von multiparallelen Hauptkanälen und Sortiermodulen mit jeweils einer Weiche zur Aufteilung in zwei verschiedene Auslaßkanäle A, B verzweigt,
- b) daß innerhalb eines Sortiermoduls an jedem Hauptkanal mindestens ein Sensor und an jeder Weiche ein von dem jeweiligen Sensore gesteuerter Sortieraktor angeordnet sind,
- c) und daß jeder Auslaßkanal B mit einem Summenkanal für die unselektierten Zellen und jeder Auslaßkanal A mit einem Summenkanal für die selektierten Zellen verbunden ist.

Vorteilhaft ist an jedem Hauptkanal ein optischer Sensor zur Bestimmung der Zellengröße angeordnet. Zweckmäßig sind dabei die an den Hauptkanälen angeordneten optischen Sensoren über einen Lichtleiter mit einer externen Lichtquelle verbunden. Als optische Sen-

soren werden vorteilhaft Fluoreszenzsensoren eingesetzt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das mikrostrukturierte System einschließlich der optischen Sensoren und der Sortieraktoren in einen monolithischen Block integriert, wobei der monolithische Block vorzugsweise 200 bis 1000 Sortiermodule enthält und die lichte Weite der Kanäle 5 µm bis 60 µm beträgt.

Besonders vorteilhaft werden dabei sämtliche Elemente des mikrostrukturierten Systems einschließlich der Steuerelektronik fotolithografisch in einen Silizium-Chip integriert.

Entsprechend einer apparativen Weiterbildung bzw. Komplettierung sind die Sortiermodule mit einem gemeinsamen, externen Rechner verbunden, der den Schwellwert bzw. den Maximalwert für die Selektierung der Zellen vorgibt.

Als Sortieraktoren können zur Steuerung der biologischen Flüssigkeitsströme piezoelektrische, magnetostruktive, fluidische oder ultraschallaktive Bauelemente eingesetzt werden.

Auf der Grundlage der Erfindung kann mit Hilfe der Methoden aus der Mikrosystemtechnik unter Anwendung des bekannten Prinzips "Messen-Entscheiden-Sortieren" ein Zellsortierapparat realisiert werden, dessen Leistungsfähigkeit gegenüber konventionellen Zellsortierapparaten um mindestens zwei Größenordnungen gesteigert ist, was einen signifikanten Fortschritt bei der Lösung des Problems der Zellsortierung darstellt. So können z. B. innerhalb von 24 h 10^{10} Zellen gegenüber 10^8 Zellen in konventionellen Geräten prozessiert werden. Aufgrund der Fertigung des Sortierapparates mit Hilfe der Mikrosystemtechnik können bei entsprechend hohen Stückzahlen die Herstellungskosten einer solchen Vorrichtung deutlich gesenkt werden.

Der erfindungsgemäße Mikrosystem-Sortierapparat kann zum Screening von Transfektionen und Zellbibliotheken, zur Anreicherung von High-Producern bei Pro und Eukaryonten und ggf. in der Medizintechnik zur Anreicherung von Knochenmarkstammzellen eingesetzt werden.

Im Folgenden wird die Erfindung an Hand von Zeichnungen und Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 schematisch den Aufbau der neuen Sortiervorrichtung,

Fig. 2 den prinzipiellen Aufbau eines Sortiermoduls,

Fig. 3a und 3b das Funktionsprinzip eines piezoelektrischen Sortieraktors,

Fig. 4 das Funktionsprinzip eines fluidischen Sortieraktors,

Fig. 5a und 5b einen Sortieraktor mit elektrostatischem Antrieb,

Fig. 6 einen elektromagnetischen Sortieraktor für magnetisch markierte Zellen und

Fig. 7 eine modulare Hintereinanderschaltung von magnetischen und optischen Sortiermodulen.

Bei der in Fig. 1 schematisch dargestellten Sortiervorrichtung wird der zu sortierende, durch die Zuführung 1 strömende Zellstrom 2 über die Hauptkanäle 3 auf einzelne Sortiermodule 4 aufgeteilt, die unabhängig voneinander parallel die jeweiligen Teilströme verarbeiten. Die Hauptkanäle 3 sind dabei als Mikrokanäle mit einem Durchmesser bzw. einer Kanalweite von 7 µm ausgebildet. Nach der Sortierung vereinigen sich die Ströme der positiven und der negativen Kanäle aus jedem Einzelmodul 4 zu einem Summenkanal 5 der positiven und einem Summenkanal 6 der negativen Zellen.

Die positiven Zellen werden in dem Auffanggefäß 7, die negativen Zellen in dem Gefäß 8 gesammelt. Durch den multiparallelen Betrieb einer großen Anzahl solcher Einheiten, vorzugsweise > 100 , in einem sog. "Sorter-Array" kann eine beträchtliche Steigerung des Durchsatzes erreicht werden.

Der Aufbau des individuellen Sortiermoduls 4 des Sorter-Arrays ist in Fig. 2 dargestellt. Er umfaßt hier jeweils einen Hauptkanal 3 mit einem Streulichtsensor 9, einem Fluoreszenzsensor 10 und einer stromabwärts von den Sensoren angeordneten Weiche 11 mit einem Sortieraktor 12. Mit dem Streulichtsensor werden die zu sortierenden Zellen nach ihrer geometrischen Größe klassifiziert, um einerseits Störsignale zu unterdrücken und andererseits als Sortierparameter zur Verfügung zu stehen. Als Effekt wird hier die größenabhängige Lichtstreuung der Zellen bei der Wellenlänge des Anregungslichts ausgenutzt. Dieses Prinzip wird auch bei dem konventionellen FACS angewandt. Die Fluoreszenzintensität als Hauptparameter wird von dem optischen Detektor 10 detektiert. Die Detektoren 9 und 10, ggf. in Kombination mit optischen Filtern, sind unter dem Hauptkanal 3 angeordnet. Das Anregungslicht wird von einer außerhalb angeordneten Beleuchtungseinrichtung 13 über Lichtleiter herangeführt.

Die Detektoren 9 und 10 sind über die Leitungen 14 mit einer Auswerte- und Steuerelektronik 15 verbunden, die über die Leitung 16 mit dem Sortieraktor 12 und über die Leitung 17 mit einem externen Rechner 18 in Verbindung steht. Die gesamte Elektronik 15 besteht aus einem Verstärkungsteil für das Meßsignal z. B. mit Feldeffekttransistoren und einem Steuerteil. Im Steuerteil kommen Speicher, Logikelemente wie z. B. Komparatoren und Module für die Datenkommunikation zum Einsatz. Der Hauptkanal 3 mit der Weiche 11, die optischen Sensoren 9 und 10, der Sortieraktor 12 sowie die Auswerte- und Steuerelektronik 15 sind einschließlich der elektrischen Leitungen 14, 16, 17 auf einem monolithischen Silizium-Chip integriert. Der gesamte Elektronikteil 15 wird dabei als ASIC (anwendungsspezifischer integrierter Schaltkreis) auf dem Si-Chip ausgeführt. Die auf dem Chip integrierten elektrischen Verbindungen 14 versorgen die Steuerelektronik 15 mit den Informationen, um den Sortieraktor 12, z. B. ein Piezoelement, zu betätigen. Die Datenverarbeitung erfolgt parallel in jedem Einzelmodul. Lediglich die Sortierkriterien werden von dem externen Rechner 18 für alle Module gemeinsam vorgegeben. Als Sortierkriterium können hier relative Schwellwerte zugrunde gelegt werden. So bewirkt z. B. der Sortieraktor 12 eine Umleitung der Zellströmung auf den Schenkel bzw. Auslaßkanal 19 der Weiche 11, wenn das Meßsignal $> 20\%$ und $< 80\%$ des als Fluoreszenzmittelwert vorgegebenen Sollwerts ist. Außerhalb des Sortiermoduls 4 ist der abzweigende Schenkel bzw. Auslaßkanal 19 der Weiche 11 mit dem Summenkanal 5 und der geradlinige Schenkel bzw. Auslaßkanal 20 mit dem Summenkanal 6 verbunden (s. Fig. 1).

Analog zu den bekannten Zellsortierapparaten wird also die Zellströmung bei einer positiven Sortierentscheidung so beeinflusst, daß die zu sortierenden Zellen in den Schenkel bzw. Auslaßkanal 19 und damit in den Summenkanal 5 austreten, während die restlichen Zellen das Modul durch den Auslaßkanal 20 verlassen und dem anderen Summenkanal 6 zugeführt werden (s. auch Fig. 1). Bei einer Parallelschaltung von ca. 1000 Einzelmodulen 4 kann der Durchsatz und damit die Ausbeute bei der Zellsortierung um mehrere Größenordnungen

gesteigert werden.

Für den Sortieraktor, der die Strömung der Zelldispersion in der oben beschriebenen Weise beeinflusst, kommen eine Reihe von Aktorprinzipien in Frage. Zunächst werden an Hand von Fig. 3a und 3b Verfahren beschrieben, die zu einer Verengung des Kanal- bzw. Schenkelquerschnitts 20 führen. Die Fig. 3a und 3b zeigen einen Querschnitt durch das Si-Grundmaterial 22 mit dem Auslaßkanal 20. Oberhalb des Auslaßkanals 20 ist ein kanalverengender Aktor 22 in Form einer Blattfeder angeordnet, der sich in Fig. 3a im entspannten Zustand und in Fig. 3b im aktivierten Zustand befindet. Ein derartiger Aktor kann als Piezoelement ausgeführt werden. Die Verwendung des piezoelektrischen Ablenkungsprinzips für Zellsortierer ist bereits bekannt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung an ein derartiges Element wird die Blattfeder mehr oder weniger durchgebogen. Als Material kommt dafür Polysilizium in Frage, das bereits als Bestandteil eines piezoresistiven Drucksensors beschrieben wurde. Außerdem sind piezoelektrische Aktoren auf der Basis von Lithiumniobat bekannt. Ferner wurden auch Ultraschallgeber für die Beeinflussung von Zellströmen eingesetzt.

Ein äquivalenter Effekt kann auch durch einen thermomechanischen Aktor erzielt werden. Hierbei wird eine Siliziumfederstruktur ausgewölbt, so daß wiederum die Strömung der Zelldispersion aufgrund einer Kanalverengung beeinflusst werden kann. Außerdem sind Zungen bekannt, die sich unter dem Einfluß eines externen Magnetfeldes durch magnetostruktive Kräfte verbiegen und auf diese Weise den Kanalquerschnitt verengen können.

Darüberhinaus sollten auch fluidische Elemente, bei denen kleine Flüssigkeitsströmungen große Flüssigkeitsströme steuern, die gestellte Aufgabe lösen können. Ein nach diesem Prinzip arbeitender Sortieraktor ist schematisch in Fig. 4 dargestellt. In einem mikrostrukturierten Grundmaterial befinden sich die Kanäle 23 mit den Wandungen 24, die die Flüssigkeitsströme begrenzen. Die Zelldispersion 2 tritt durch eine Eintrittsdüse 25 in das Sortiermodul ein und wird hierbei seitlich durch einen kleinen Flüssigkeitssteuerstrom 26 beeinflusst. Dieser Steuerstrom, der durch die Einlaßöffnungen 27 beispielsweise von links nach rechts fließt, führt dazu, daß sich der Zellstrom 2 aufgrund des Coanda-Effekts an die rechte Seite anschmiegt und somit das Sortiermodul durch die Austrittsöffnung 28 verläßt. Bei einer entgegengesetzten Flußrichtung des Steuerstroms stellen sich die Verhältnisse seitenverkehrt dar und der Hauptstrom würde das Modul durch die Öffnung 29 verlassen. Die Ausgleichsöffnungen 30 dienen zum Druckausgleich im Modul.

Weiterhin können Sortieraktoren auf der Basis von schiebergesteuerten Ventilen eingesetzt werden. Ein derartiger elektromechanisch betriebener Sortieraktor ist in den Fig. 5a und 5b dargestellt. Er besteht aus einem Plattenkondensator 31 mit einer feststehenden 32 und einer beweglichen Platte 33. An der beweglichen Platte 33 ist eine Ventilscheibe 34 angebracht, die den Kanalquerschnitt des Auslaßkanals 20 der Weiche 11 verschließen kann. Auf diese Weise kann die Strömung der Zelldispersion in dem Sortiermodul bzw. im Auslaßkanal 20 in Abhängigkeit der angelegten elektrischen Spannung gezielt beeinflusst werden. In Fig. 5a ist der Zustand dargestellt, bei dem die durch den Hauptkanal 3 einfließende Zelldispersion ungestört durch den Auslaßkanal 20 austritt. Im Fall einer positiven Sortierentscheidung wird die Ventilscheibe 34 gem. Fig. 5b in den

Kanal 20 eingefahren, so daß die Dispersion in den anderen Auslaßkanal 19 abgelenkt wird.

Der Vorteil einer Separation von magnetisch markierten Zellen besteht darin, daß im Gegensatz zur Fluoreszenzmarkierung auf eine Sensoreinrichtung verzichtet werden kann. In diesem Sinn wird die magnetische Markierung von einem als Aktor wirkenden Magnetfeld als sortiertechnisch relevante physikalische Größe verwendet. Die zur Ablenkung nötigen Magnetfelder von magnetisch markierten Zellen werden durch planare Magnetspulen, deren Windungen z. B. aus Gold bestehen, realisiert. Auf diesem Prinzip beruht ein bekannter magnetischer Mikromotor, der auf Si-Substrat hergestellt wurde. In Fig. 6 ist ein entsprechendes magnetisches Ablenkmodul schematisch dargestellt. Die Zellen 35 treten in das Modul wieder über den Hauptkanal 3 ein. Entlang der Kanalstruktur sind planar aufgebraute Magnetspulen 36 angebracht, die ggf. in einer zweiten Ebene über den Kanälen liegen. Mit dieser Anordnung der Spulen 36 wird der Ablenkweg für die Zellen 35 festgelegt, die magnetische Beads als Markierung tragen und damit das Modul durch den Auslaßkanal 19 verlassen. Magnetisch unmarkierte Zellen werden von den Magnetfeldern nicht abgelenkt und passieren daher das Modul durch den anderen Auslaßkanal 20.

Ein derartiger magnetischer Sortiermodul kann auch mit den oben beschriebenen optischen Sortiermodulen 4 in Fig. 1 kombiniert werden, womit ein zusätzlicher Sortierparameter zur Verfügung steht. Fig. 7 zeigt schematisch eine Anordnung für zwei parallel ausgeführte Sortiereinheiten. Eine Einheit besteht hierbei aus einem magnetischen Sortiermodul 37 bzw. 38 (gem. Fig. 6) und jeweils aus zwei über die Auslaßkanäle 39, 40 bzw. 41, 42 verbundenen optischen Sortiereinheiten 43, 44 bzw. 45, 46. Mit dieser Anordnung können in dem Summenkanal 47 die magnetisch positiv und Fluoreszenz-positiv gemessenen Zellen, im Summenkanal 48 die magnetisch positiven und Fluoreszenz-negativen, im Summenkanal 49 die magnetisch negativen und Fluoreszenz-positiven und im Summenkanal 50 die magnetisch negativen und Fluoreszenz-negativen Zellen gesammelt werden.

Falls nur mit magnetisch markierten Zellen gearbeitet wird, kann ein magnetisches Ablenkmodul 37 oder 38 das optische Sortiermodul 4 in Fig. 1 ersetzen. Durch die gezielte Einstellung der Magnetfelder können in einer Kaskadenanordnung von magnetischen Ablenkeinheiten die Zellen nach der Anzahl der gebundenen magnetischen Beads differenziert werden.

Die Dimensionen eines Moduls richten sich nach der Größe der Zellen, die sortiert werden sollen. Der Durchmesser der Kanäle für Bakterien beträgt in der Regel 5–10 µm, der für eukaryontische Zellen 30–60 µm. Als Grundmaterial für die mikrostrukturierte Sortiervorrichtung dient vorzugsweise Silizium, da sich hier sowohl Kanalstrukturen und optische Detektionselemente (Photodioden) als auch die Steuerelektronik monolithisch integrieren lassen. Hierbei werden die in der Halbleitertechnik üblichen Verfahren der Photolithographie, Ionendiffusion, Aufdampftechniken und naßchemisches Ätzen eingesetzt.

Patentansprüche

1. Sortiervorrichtung für in Flüssigkeiten dispergierte biologische Objekte, insbesondere Zellen oder Viren, bei der die Objekte in einer für die Sortierung signifikanten Weise magnetisch markiert sind, bestehend aus

- i) einem mit einer Zuführung (1) verbundenen, von der biologischen Flüssigkeit durchströmten Hauptkanal (3) und einer am Hauptkanal (3) angeordneten Weiche (11) mit mindestens zwei Auslaßkanälen (19, 20) 5
- ii) und einem an der Weiche (11) angebrachten Sortieraktor (12), der die magnetisch markierten Zellen selektiv auf einen der beiden Auslaßkanäle (19, 20) verteilt, **dadurch gekennzeichnet** 10
- a) daß sich die Zuführung (1) in ein mikrostrukturiertes System von multiparallelen Hauptkanälen (3) und Sortiermodulen (4) mit jeweils einer Weiche (11) zur Aufteilung in zwei verschiedene Auslaßkanäle (19, 20) verzweigt, 15
- b) daß innerhalb eines Sortiermoduls (4) an jedem Hauptkanal (3) ein magnetischer Ablenkmodul (37, 38) als Sortieraktor (12) angeordnet ist
- c) und daß jeder Auslaßkanal (20) mit einem Summenkanal (6) für die unselektierten Zellen und jeder Auslaßkanal (19) mit einem Summenkanal (5) für die selektierten Zellen verbunden ist. 20
2. Sortiervorrichtung für in Flüssigkeiten dispergierte biologische Objekte, insbesondere Zellen oder Viren, bei der die Objekte ggf. in einer für die Sortierung signifikanten Weise markiert sind, bestehend aus 25
- i) einem mit einer Zuführung (1) verbundenen, von der biologischen Flüssigkeit durchströmten Hauptkanal (3) und einer am Hauptkanal (3) angeordneten Weiche (11) mit mindestens zwei Auslaßkanälen (19, 20) 30
- ii) mindestens einem am Hauptkanal (3) angeordneten Sensor (9 oder 10), der die ggf. markierten Zellen detektiert und klassifiziert 35
- iii) und einem an der Weiche (11) angebrachten Sortieraktor (12), der die klassifizierten Zellen anschließend selektiv auf einen der beiden Auslaßkanäle (19, 20) verteilt, **dadurch gekennzeichnet** 40
- a) daß sich die Zuführung (1) in ein mikrostrukturiertes System von multiparallelen Hauptkanälen (3) und Sortiermodulen (4) mit jeweils einer Weiche (11) zur Aufteilung in zwei verschiedene Auslaßkanäle (19, 20) verzweigt, 45
- b) daß innerhalb eines Sortiermoduls (4) an jedem Hauptkanal (3) mindestens ein Sensor (9 oder 10) und an jeder Weiche (11) ein von dem jeweiligen Sensor gesteuerter Sortieraktor (12) angeordnet ist 50
- c) und daß jeder Auslaßkanal (20) mit einem Summenkanal (6) für die unselektierten Zellen und jeder Auslaßkanal (19) mit einem Summenkanal (5) für die selektierten Zellen verbunden ist. 55
3. Sortiervorrichtung nach Anspruch 1—2, dadurch gekennzeichnet daß an jedem Hauptkanal (3) ein optischer Sensor (9) zur Bestimmung der Zellengröße angeordnet ist. 60
4. Sortiervorrichtung nach Anspruch 1—3, dadurch gekennzeichnet daß die an den Hauptkanälen (3) angeordneten optischen Sensoren (9 und/oder 10) über Lichtleiter mit einer externen Lichtquelle (13) verbunden sind. 65
5. Sortiervorrichtung nach Anspruch 1—4, dadurch gekennzeichnet daß mindestes ein optischer Sensor

aus einem Fluoreszenzsensor (10) besteht.

6. Sortiervorrichtung nach Anspruch 1—5, dadurch gekennzeichnet daß das mikrostrukturierte System einschließlich der optischen Sensoren (9 und/oder 10), der Sortieraktoren (12) und einer mit den Sensoren (9 und/oder 10) und den Sortieraktoren (12) verbundenen Auswerte- und Steuerelektronik (15) in einen monolithischen Block integriert sind.

7. Sortiervorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet daß der monolithische Block 200 bis 1000 Sortiermodule (4) enthält und daß die lichte Weite der Kanäle (3, 19, 20) 5 bis 60 µm beträgt.

8. Sortiervorrichtung nach Anspruch 6—7, dadurch gekennzeichnet daß sämtliche Elemente des mikrostrukturierten Systems einschließlich der Steuerelektronik (15) fotolithografisch in einen Silizium-Chip integriert sind.

9. Sortiervorrichtung nach Anspruch 1—8, dadurch gekennzeichnet daß die Sortiermodule (4) mit einem gemeinsamen, externen Rechner (18) verbunden sind, der den Schwellwert und den Maximalwert für die Selektierung der Zellen vorgibt.

10. Sortiervorrichtung nach Anspruch 1—9, dadurch gekennzeichnet daß als Sortieraktoren (12) zur Steuerung der biologischen Flüssigkeitsströme piezoelektrische, magnetostruktive, fluidische oder ultraschallaktive Bauelemente eingesetzt werden.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

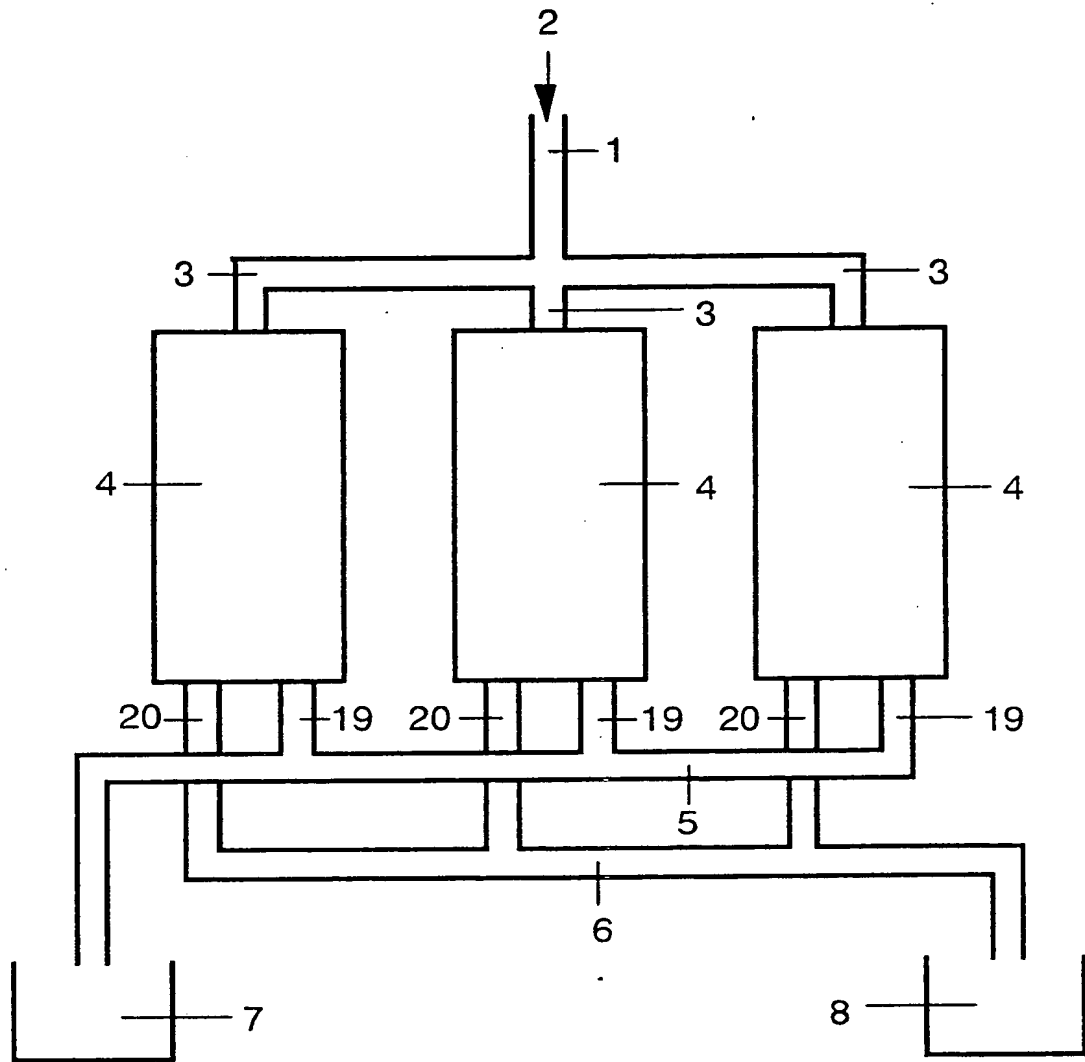


Fig. 1

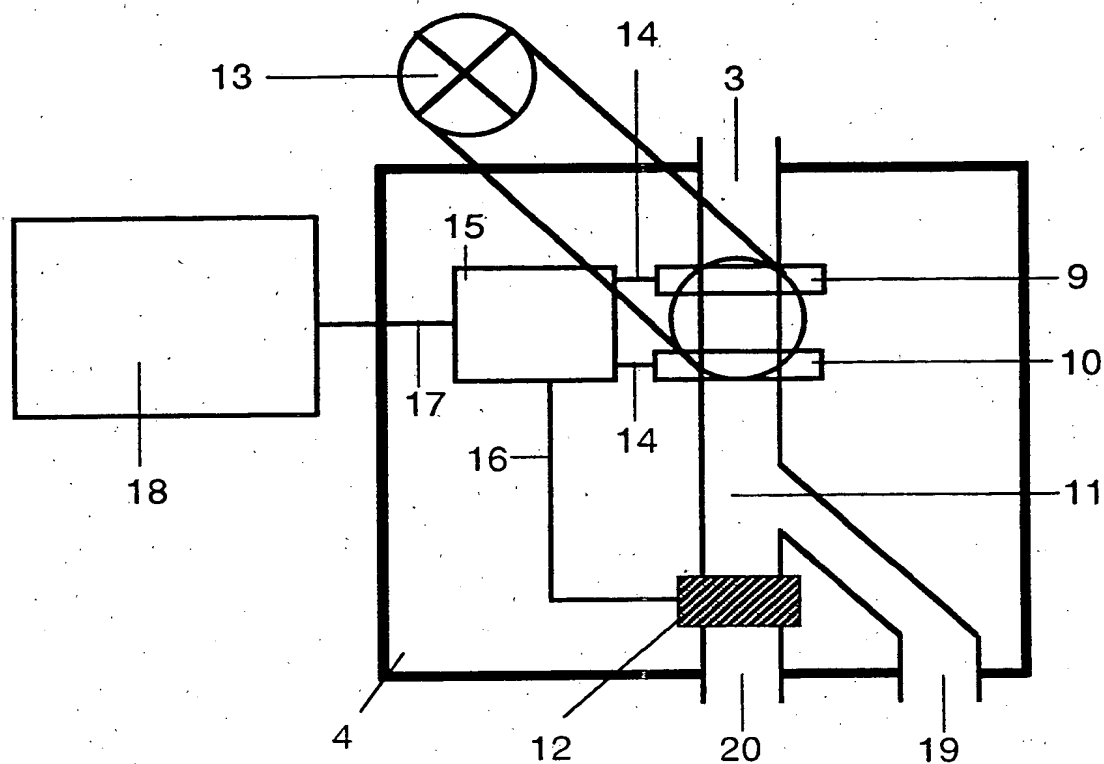


Fig. 2

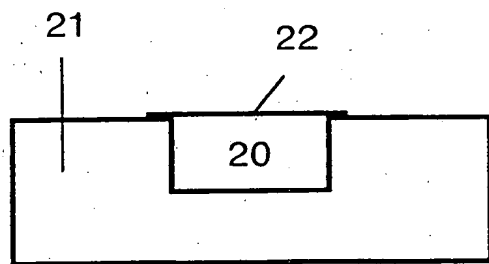


Fig. 3a

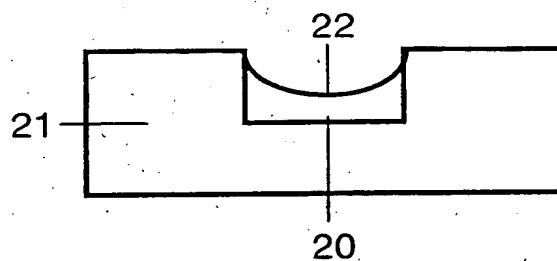


Fig. 3 b

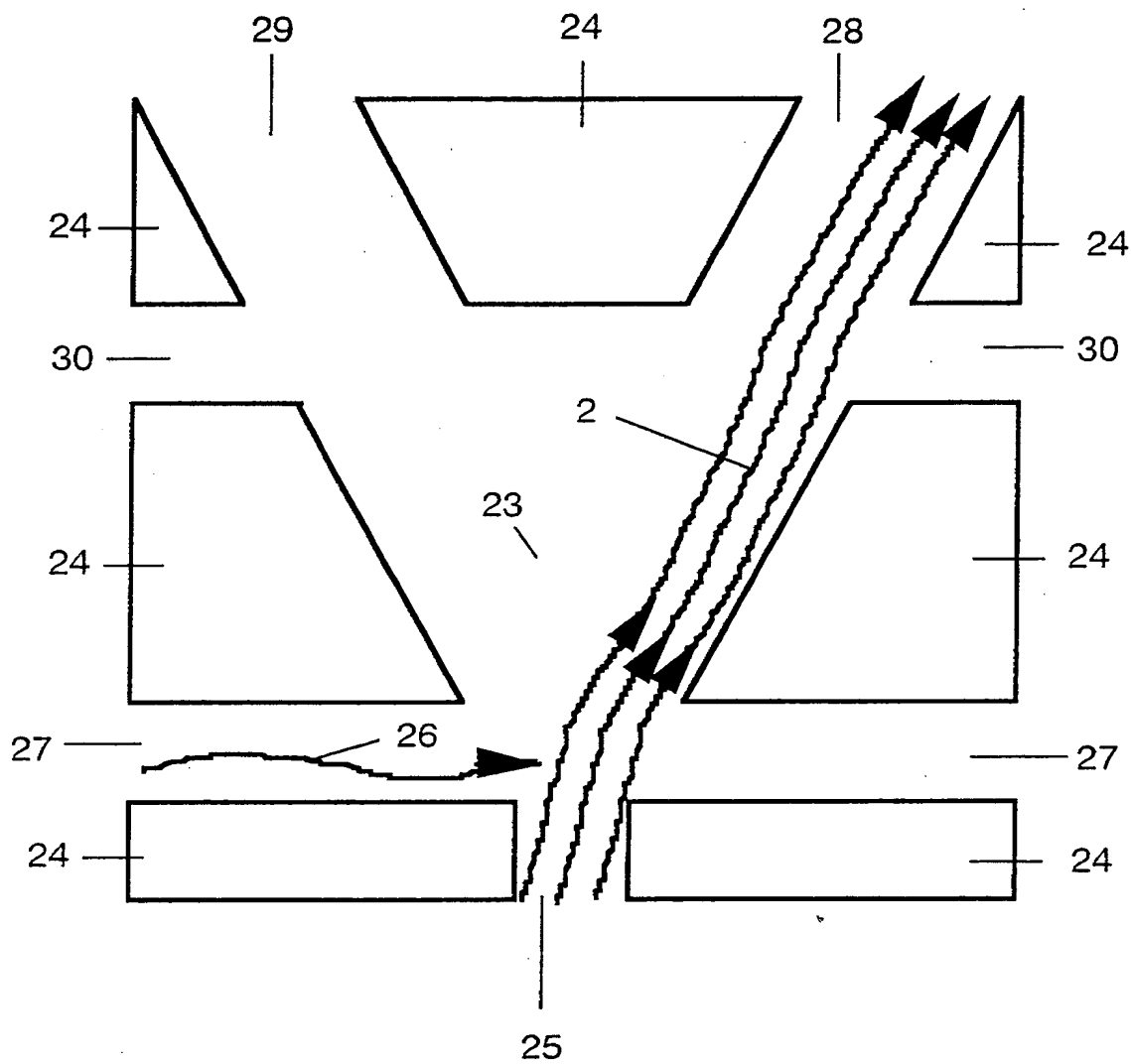


Fig. 4

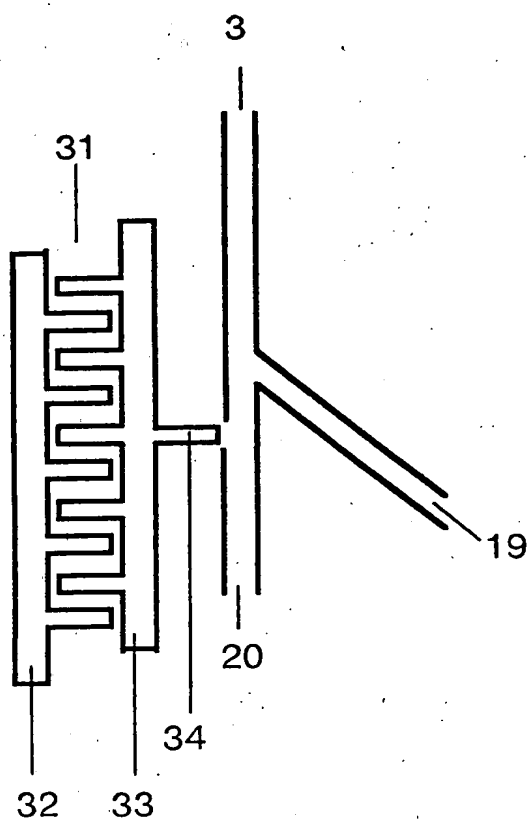


Fig. 5a

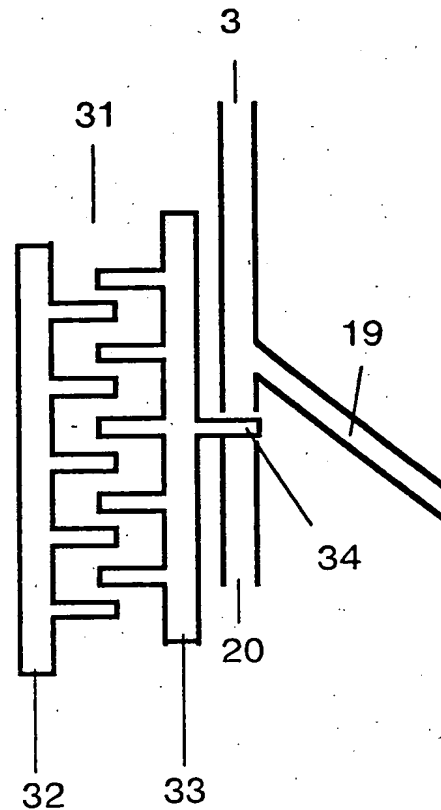


Fig. 5b

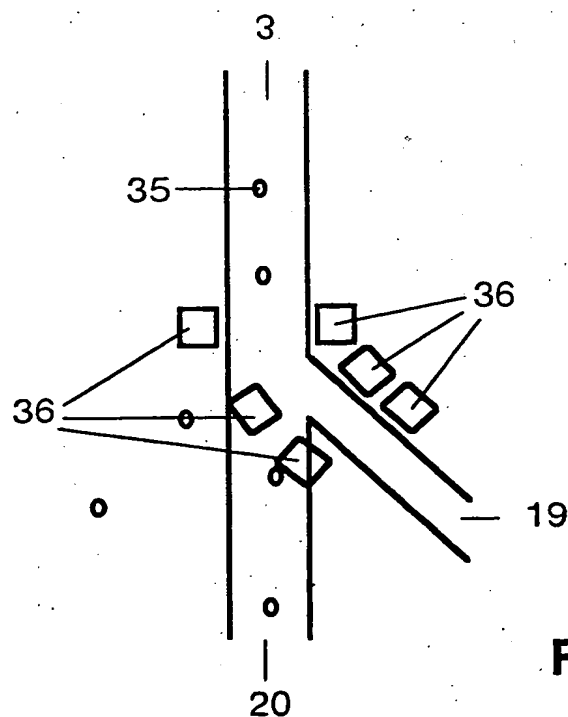


Fig. 6

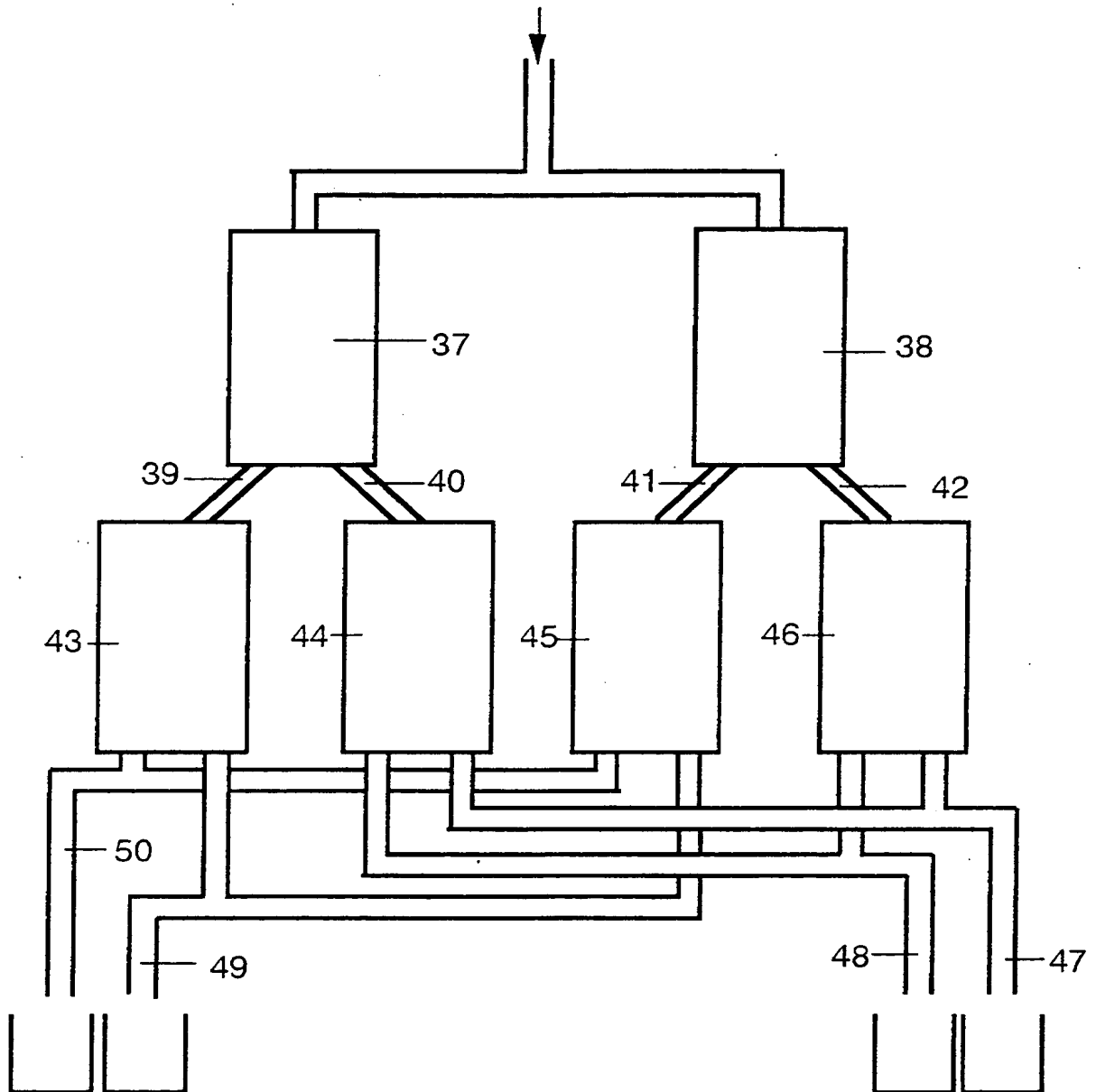


Fig. 7